



TITLE:

NONSPECIFIC CATALYSES BY  
TRYPSIN AND  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Inagami, Tadashi

---

CITATION:

Inagami, Tadashi. NONSPECIFIC CATALYSES BY TRYPSIN AND  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN. 京都大学, 1963, 農学博士

ISSUE DATE:

1963-12-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/211180>

RIGHT:

氏 名	稲 上 正 <small>いな がみ ただし</small>
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	論 農 博 第 39 号
学位授与の日付	昭 和 38 年 12 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	<b>NONSPECIFIC CATALYSES BY TRYPSIN AND <math>\alpha</math>- CHYMOTRYPSIN</b> (トリプシンとアルファーキモトリプシンによる非特異的酵素作用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 満 田 久 輝 教 授 三 井 哲 夫 教 授 緒 方 浩 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

トリプシンとキモトリプシンはほとんど同一の分子量をもつ球状タンパクであり、おのおののアミノ酸組成が類似しているので等電点は共にアルカリ側にあつて近い値を示している。酵素としての性質においては両者はエンドペプチダーゼであると同時にアミノ酸のアミドやエステルをも水解する。さらにこのエステルとアミドの分解速度の比はこれら二つの酵素についてはほとんど同一である。両酵素は diisopropylfluorophosphate (DIP) その他のリン酸化合物により同一の様式で阻害を受ける。この阻害にあつて両酵素とも活性中心のセリン基の水酸基がリン酸化されることが見出され続いてこのセリン基の附近のアミノ酸配列は同一で gly.-asp.-ser.-gly. であることがすでに明らかにされている。酵素反応速度の pH および温度による変化も両者はよく類似しており、この変化の様式から著者はヒスチジンのイミダゾール基が酵素活性に重要な役割を演ずると推論している。

これら両酵素の唯一の重要な差は基質となるアミノ酸に対する特異性にある。トリプシンは塩基性アミノ酸リジンおよびアルギニンにのみ非常に明確な特異性を示している。一方キモトリプシンは芳香族アミノ酸に最も強く作用するが多くの中性直鎖アミノ酸にも作用する。

酵素の活性中心は酵素タンパクと基質分子の特異的結合にあづかる特異中心と直接化学反応を触媒する反応中心の二つにすくなくとも機能的に分けて考えられている。これを上述のトリプシンとキモトリプシンの場合にあてはめると、両酵素では特異中心が異なっていて反応中心が非常によく類似していると推論できる。したがってこれら両酵素を共通の基質を用いて比較研究するとき反応中心と特異中心のそれぞれの作用を分離して解明する可能性を与えるものと考えられる。

まず考えられる共通の基質として両酵素のそれぞれの特異基質を互いに交換することである。トリプシンの基質 benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) とキモトリプシンの基質 acetyl-L-tyrosine ethylester (ATEE) とを交換して両酵素の基質として反応させると非特異的な水解作用を受けることが観察された。これが実際に非特異的触媒作用であつて混在する特異的酵素によるものでないことはそれぞれの

素に対する阻害剤を用いて確かめている。すなわちトリプシンの非特異的作用は特異的作用と同様に大豆トリプシンインヒビター (STI) により阻害され、キモトリプシンの場合も両反応が共にインドールにより阻害される。その上これら非特異反応の Michaelis 恒数 ( $k_m$ ) が特異反応の場合より一桁も二桁も大きいこともこの結論に有力な支持をあたえている。

グリシンには側鎖がないから若し acetyl glycine ethyl ester (AGEE) が両酵素により水解されると、この反応は純粋に反応中心のみによるものと考えられる。事実両酵素は非常に微弱ではあるが AGEE の水解を触媒する。この速度恒数  $K_s$  はトリプシンの場合  $0.002\text{sec}^{-1}$  で特異的な BAEE の水解 ( $15\text{sec}^{-1}$ ) の約10万分の15であり、キモトリプシンでは  $0.006\text{sec}^{-1}$  特異的な ATEE 水解 ( $160\text{sec}^{-1}$ ) の約10万分の4のごとく非常に小さく、反応速度の測定には多量の酵素タンパクを必要とする。しかし両酵素による AGEE の水解作用がそれぞれの特異的阻害剤すなわち STI およびインドールにより特異反応の場合と同様に阻害されることはタンパク質の一般的な作用ではなく酵素作用によるものであることを実証している。

また両酵素による水解作用の  $k_s$  および  $k_m$  の pH による変化を調べたところ、両酵素はきわめて顕著な類似性を有していることも明らかにされた。この事実も両酵素の反応中心の類似性を一層強力に証明するものである。

#### 論文審査の結果の要旨

酵素作用には至適温度、至適水素イオン濃度のほか基質 (substrate) に対する特異性 (specificity) という重要な三つの性質がある。酵素と基質は "key and keyhole" の関係にある。

酵素の一種である proteolytic enzyme は peptide 結合の加水分解酵素であって protein, peptone, polypeptide, 合成 peptide などに作用する。この中 protein や polypeptide の末端の peptide 結合のみに作用してアミノ酸を遊離する exopeptidase と、しからざる peptide 結合に作用する endopeptidase の2群に分けられる。トリプシンおよびキモトリプシンは後者に属している。

酵素の活性中心は特異中心と反応中心とからなると考えられているが、トリプシンとキモトリプシンは種々の実験事実からその反応中心が類似していて特異中心が異なっていると考えられる。両酵素について共通の基質に対するそれぞれの作用を比較し、特異中心の作用を反応中心の作用から分離して研究することは可能であると考え、著者はトリプシンの特異基質ベンゾイルアルギニンエチルエステルはキモトリプシンによっても分解されること、またキモトリプシンの特異基質アセチルチロシンエチルエステルは逆にトリプシンによっても分解されることを見出し、これが混在する酵素によるものでないことをそれぞれの酵素の特異的阻害剤を用いて証明している点は、とくに本論文中最も高く評価してよい業績であり、酵素化学の領域において国の内外から賞讃されているところである。

よって本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。